

## مقاله تحقیقی

### بررسی میان‌کنش ویتامین A و اسکوپولامین بر میزان به‌یادآوری حافظه در موش‌های صحرایی نر بالغ

اکرم عیدی<sup>۱\*</sup>، مهسا جولائیان<sup>۱</sup>، علی حائری روحانی<sup>۱</sup>، طاهره اشراقی<sup>۱</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

\* **مسئول مکاتبات:** اکرم عیدی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، تلفن: ۴۴۸۶۵۹۳۹، پست الکترونیکی: eidi@srbiau.ac.ir

**محل انجام تحقیق:** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۱۶

## چکیده

ویتامین A، ماده غذایی کمیابی است که اثرات بیولوژیکی وسیعی در ارتباط با مورفوزن، بینایی، سیستم ایمنی، تولیدمثل، رشد و نمو نورونی و تمایز سلول‌های بدن دارد. اثرات سلولی ویتامین A عمدتاً از طریق اتصال متابولیت فعال آن، یعنی اسید رتینوئیک به گیرنده‌های هسته‌ای میانجی‌گری می‌شود. رتینوئیدها و خصوصاً اسید رتینوئیک، به عنوان متابولیت فعال ویتامین A نقش مهمی در رشد و نمو سیستم عصبی مرکزی دارند. تعدادی از مطالعات تجربی پیشنهاد نموده است که اسید رتینوئیک نقش مهمی در عملکرد مغز بالغ دارد. در تحقیق حاضر، میان‌کنش ویتامین A و اسکوپولامین (آنتاگونیست گیرنده موسکاربینی) بر میزان به‌یادآوری حافظه در موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار بررسی شده است. حیوانات به ۱۳ گروه تقسیم شدند که تعداد حیوانات در هر گروه ۷ سر بود. پس از جلسه آموزش، تزریقات درون بطنی (intracerebroventricular, i.c.v.) در تمامی حیوانات انجام گردید. میزان به‌یادآوری حافظه با استفاده از روش یادگیری احترازی غیرفعال در موش‌های صحرایی نر بالغ، بررسی شد. نتایج نشان داد که ویتامین A (۲۰۰۰ IU/rat، ۱۰۰۰) به‌یادآوری حافظه را افزایش و اسکوپولامین (۵ µg/rat و ۱) به‌یادآوری حافظه را کاهش می‌دهد. ویتامین A، پاسخدهی به اسکوپولامین را کاهش می‌دهد و پاسخدهی به ویتامین A توسط اسکوپولامین تضعیف می‌شود. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، احتمالاً میان‌کنشی بین ویتامین A و سیستم کولینرژیک در فرآیند به‌یادآوری حافظه وجود دارد.

**واژه‌های کلیدی:** ویتامین A، سیستم کولینرژیک، اسکوپولامین، یادگیری احترازی غیرفعال، موش صحرایی

## مقدمه

دخالته می‌کند. اگرچه، عملکرد اسید رتینوئیک در دستگاه عصبی مرکزی به خوبی شناخته نشده است (۲،۳)، اما مشخص شده است که رتینوئیدها در تنظیم فعالیت‌های مغز بالغ اثر دارند (۴). رتینوئیدها نقش مهمی در عملکرد مغز بالغ در بخش‌هایی نظیر

ویتامین A به عنوان یک ماده ضروری برای رشد و نمو، در سال ۱۹۱۵ شناخته شد. این ویتامین در بسیاری از اعمال فیزیولوژیکی نظیر بینایی، تولیدمثل، توسعه بافت اپی‌تلیال، تمایز جنسی، رشد و تکامل مغز (۱) و اعمالی چون حافظه و یادگیری،

کولینرژیک، فعالیت‌های شناختی را ارتقاء می‌بخشند، در حالی که آنتاگونیست‌های کولینرژیک و مهارکننده‌های گیرنده‌های موسکارینی مثل اسکوپولامین، باعث ایجاد اختلال و کاهش بسیار عمیق و محسوس در فرآیند حافظه می‌گردند (۱۸). در تحقیق حاضر، اثر تزریق درون بطنی ویتامین A و اسکوپولامین و میان‌کنش بین این دو بر فرآیند به یادآوری حافظه در موش‌های صحرایی نر بالغ، مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### حیوانات

در تحقیق حاضر، از موش‌های نر نژاد ویستار، با وزن اولیه ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شده است. حیوانات در هر قفس در گروه‌های پنج‌تایی با دسترسی آزاد به آب و غذا و اتاق حیوانات با دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. همه آزمون‌های رفتاری در فاصله زمانی بین ساعت ۰۸:۰۰ و ۱۳:۰۰ انجام گردید. هر حیوان فقط یک‌بار استفاده شد. در هر گروه، ۷ سر حیوان وجود دارد.

#### داروها

ویتامین A، از شرکت داروسازی اسوه، اسکوپولامین، از شرکت سینادارو و روغن کنجد (Henrylamot Germany) خریداری گردیدند. تمامی داروها بلافاصله بعد از دوره آموزش، در حجم  $1 \mu\text{l}/\text{rat}$  تزریق شدند. سرم فیزیولوژیک به عنوان حلال اسکوپولامین و روغن کنجد به عنوان حلال ویتامین A استفاده گردید.

#### جراحی به منظور کاشت کانولا راهنما

یک کانولای استیل ضدزنگ با ضخامت Gauge ۲۱ با استفاده از دستگاه استریوتاکس در بطن جانبی راست تمامی حیوانات کاشته شد (David Kopf، آمریکا). حیوانات با هیدروکسی کتامین ( $40 \text{ mg}/\text{kg}$ ) و زایلین ( $80 \text{ mg}/\text{kg}$ ) بی‌هوش شدند. جهت تزریق درون بطن جانبی، یک

آمیگدال، هیپوتالاموس، هیپوکامپ و اجسام مخطط ایفاء می‌کنند (۵). همچنین تحقیقات انجام شده با استفاده از آگونیست گیرنده‌های رتینوئیدی نشان می‌دهد که رتینوئیدها در ناحیه  $CA_1$  و  $CA_3$  هیپوکامپ فعال هستند (۶). اثر رتینوئیدها از طریق گیرنده‌های هسته‌ای متعلق به خانواده هورمون‌های استروئیدی، تیروئیدی و ویتامین D انجام می‌شود. این گروه از گیرنده‌ها، گیرنده‌های وابسته به لیگاند هستند که با اتصال به عناصر پاسخی رتینوئیدها، به وسیله راه‌اندازی ژن‌های هدف، عمل خود را انجام می‌دهند (۷-۱۰). دو نوع گیرنده هسته‌ای برای رتینوئیدها شامل RAR و RXR شناسایی شده است که هر کدام دارای سه شکل ایزومری  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$  است (۷-۹). در این رابطه مشخص شده است که گیرنده‌های رتینوئیدی در نواحی زیادی از هیپوکامپ توزیع شده‌اند. به عنوان مثال،  $RAR\alpha$  در  $CA_1$ ،  $CA_2$ ،  $CA_3$  و شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ وجود دارد (۲،۱۰) و نیز گیرنده  $RXR\beta$  در تمامی نواحی هیپوکامپ بیان می‌شود (۱۰). تحقیقات نشان داده است که تزریق محیطی ویتامین A، روند یادگیری را بهبود می‌بخشد و از آنجایی که ناحیه  $CA_1$  هیپوکامپ در یادگیری اثر داشته و واجد گیرنده‌های رتینوئیدی است، رتینوئیدها در تنظیم فعالیت نوروترانسمیترهای موثر بر حافظه، به خصوص استیل کولین، اهمیت دارند (۲،۱۱). افزوده بر این، مشخص شده است که رتینوئیدها در رشد، متابولیسم و تمایز سلول‌های عصبی اهمیت دارند (۲،۱۲).

گیرنده‌های رتینوئیدی، در تقویت دراز مدت (Long-term potentiation, LTP) (۱۳) انعطاف‌پذیری سیناپس‌ها و نیز در تنظیم بسیاری از ژن‌های دخالت‌کننده در عملکرد طبیعی مغز نقش دارند (۱۴،۱۵).

سیستم کولینرژیک نقش مهمی در فعالیت‌های ادراکی و شناختی نظیر حافظه و یادگیری بر عهده داشته و طبق گزارش‌ها، بر اثر آسیب به سیستم کولینرژیک حافظه کاهش می‌یابد (۱۶،۱۷). مطالعات بسیاری روی سیستم کولینرژیک توسط محققان سلولی انجام گرفته که نشان داده آگونیست‌های

روش قبلی، دوباره آزمایش می‌شد و اگر در طول ۱۲۰ ثانیه، وارد فضای تاریک نمی‌شد، فراگیری موفق از پاسخ احترازی غیرفعال ثبت می‌گردید.

### تزریق درون بطن مغزی

#### (intracerebroventricular, i.c.v.)

حیوان، تزریق درون بطن مغزی را فوراً پس از دوره فراگیری از طریق کانولا دریافت می‌کرد. موش‌ها به آرامی توسط دست نگه‌داشته شده و تزریق با سوزنی به ضخامت ۲۷ Gauge صورت می‌گرفت. تزریق از طریق یک لوله پلی‌اتیلنی متصل به سرنگ هاملتون انجام می‌شد. حجم تمامی تزریقات، ۱ میکرولیتر بود. جهت اطمینان از تزریق دارو، ۳۰ ثانیه پس از تزریق، سوزن تزریق در موقعیت کانولا نگه‌داشته می‌شد.

### اندازه‌گیری میزان به‌یادآوری حافظه

۲۴ ساعت بعد از آموزش، آزمایش تعیین میزان به‌یادآوری حافظه انجام گرفت.

حیوان در محفظه روشن گذاشته شده و مدت زمان تاخیر ورود به محفظه تاریک (Step Through Latency, STL) اندازه‌گیری شد. در تمامی مراحل آزمایش، در باز بود. آزمایش وقتی تمام می‌شد که حیوان وارد محفظه تاریک می‌شد و یا برای مدت ۳۰۰ ثانیه در فضای روشن باقی می‌ماند. در طول این دوره، هیچ شوک الکتریکی اعمال نمی‌گردید.

### گروه‌های تجربی

حیوانات به ۱۳ گروه تقسیم شدند که هر گروه شامل ۷ سر بود:

گروه ۱ یا گروه کنترل (Con.): حیوانات این گروه، دست نخورده و بدون تیمار بودند.

گروه ۲ و ۳ یا گروه‌های شاهد (Sham): حیوانات این گروه، جراحی شده و سرم فیزیولوژیک یا روغن کنجد دریافت نمودند.

گروه‌های ۴-۷ یا گروه‌های دریافت کننده ویتامین A: حیوانات این گروه‌ها، ویتامین A را در

عدد کانولا با استفاده از دستگاه استریوتاکسی در مختصات ۰/۸ میلی‌متر خلفی، ۱/۶ میلی‌متر جانبی و ۳/۴ میلی‌متر شکمی نسبت به نقطه برگما بر اساس اطلس پاکسینوس قرار داده شد. با استفاده از پیچ‌های مینیاتوری و اکریل دندانپزشکی، کانولا در موقعیت خود تثبیت گردید.

### دستگاه شاتل‌باکس

آموزش در یک محفظه شرطی‌سازی با دو فضای روشن و تاریک با اندازه یکسان (۳۰×۲۰×۲۰ cm) انجام گردید. یک در گیوتینی در فاصله بین دو فضای قرار داشت که می‌توانست توسط ناظر باز یا بسته شود. شبکه‌های فلزی ضدزنگ (با ضخامت ۲/۵ میلی‌متر) در فاصله‌های ۱ سانتی‌متری (فاصله بین شبکه‌ها) روی کف فضای تاریک برای ایجاد شوک پایایی قرار داده شد. شبکه شوک‌دهنده پا (با شدت ۲ mA و مدت زمان ۱/۵ s و فرکانس ۵۰ Hz) با میله‌های فلزی فضای تاریک ارتباط داشت.

### آزمون رفتاری یادگیری احترازی غیرفعال

به تمامی حیوانات اجازه داده شد تا یک ساعت قبل از آزمایش، در دستگاه شاتل‌باکس قرار گرفته و آزادانه در هر دو محفظه حرکت نمایند. جلسات آموزش و آزمایش‌ها بین ساعت ۰۸:۰۰ و ۱۳:۰۰ انجام گرفت. پس از گذراندن جلسه عادت، حیوان به آرامی در فضای روشن برای ۵ ثانیه قرار می‌گرفت. سپس در گیوتینی، بسته شده و زمان تاخیر برای عبور حیوان به فضای تاریک، ثبت می‌گردید. حیواناتی که بیشتر از ۱۰۰ ثانیه برای عبور به طرف دیگر تاخیر می‌کردند، از آزمایش حذف می‌شدند. به محض ورود حیوان با چهار پنجه به اتاق تاریک، در بسته می‌شد و موش از فضای تاریک خارج می‌شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، حیوان در اتاق روشن قرار می‌گرفت و به محض ورود به اتاق تاریک، شوک پایایی (۱/۵ s, ۵۰ Hz, ۲ mA) دریافت می‌کرد. بعد از ۲۰ ثانیه، موش از دستگاه برداشته شده، موقتاً در قفس گذاشته می‌شد. دو دقیقه بعد، موش به همان

داده‌های رفتاری موش‌هایی که مکان کانولا صحیح نبود، بررسی نگردید.

### آنالیز آماری

تمامی داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد، تهیه شد و با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه، مورد سنجش آماری قرار گرفت.  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

### نتایج

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که حیوانات گروه‌های شاهد (Sham) تغییر معنی‌داری بر میزان STL در مقایسه با گروه کنترل (Con.) نشان ندادند، بدین معنی که عمل جراحی کاشت کانولا و تزریق سرم فیزیولوژیک یا روغن کنجد تاثیر معنی‌داری بر سطح یادگیری ایجاد نمی‌کند. ویتامین A در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ IU/rat موجب افزایش معنی‌داری بر میزان STL در مقایسه با گروه شاهد گردید (نمودار ۱).

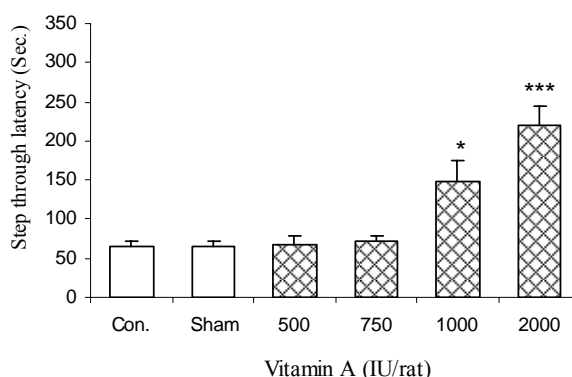
غلظت‌های IU/rat ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰ دریافت نمودند.

گروه‌های ۱۰-۸ یا گروه‌های دریافت‌کننده اسکوپولامین: حیوانات این گروه‌ها اسکوپولامین را در غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ میکروگرم بر رت دریافت نمودند.

گروه‌های ۱۱-۱۳ یا گروه‌های دریافت‌کننده توام ویتامین A و اسکوپولامین: حیوانات این گروه‌ها به صورت توام، غلظت‌های مختلف اسکوپولامین و ویتامین A با غلظت IU ۱۰۰۰ برای هر موش صحرايي دریافت نمودند.

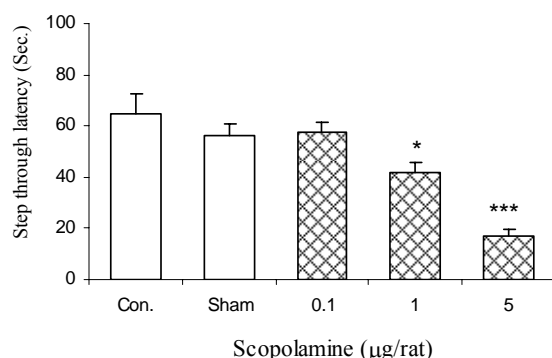
### بافت‌شناسی

در خاتمه آزمایش، تمامی موش‌ها ۲ میکرولیتر متیلن بلو را در بطن جانبی دریافت نمودند. سپس با اتر، بی‌هوش شده و به طور transcardial بافر محلول نمک‌دار فسفاتی را دریافت نموده (pH=7.4) و فرمالدئید (۱۰٪) درون کانولا تزریق می‌شد. سر تمامی موش‌ها قطع شده و مغزشان در فرمالدئید (۴٪) قرار گرفت. بعد از گذشت سه روز، مغزها با ضخامت ۶۰ میکرومتری برش داده شدند.



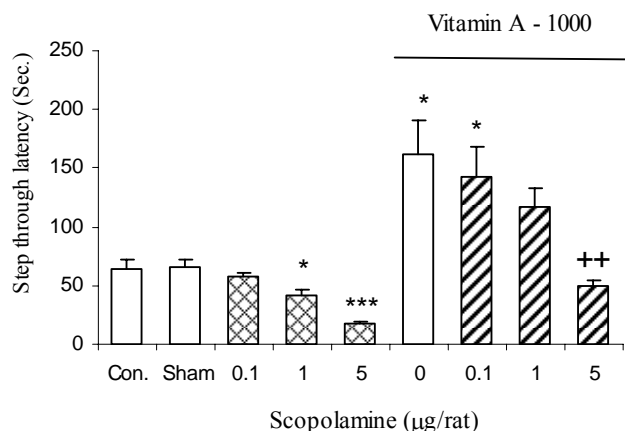
نمودار ۱ - اثر تزریق درون‌بطنی ویتامین A با غلظت‌های IU/rat ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰ بر میزان STL در موش صحرايي نر بالغ. تزریقات فوراً پس از دریافت شوک در جلسه آموزش صورت گرفت. حیوانات کنترل (Con.) هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند. حیوانات گروه شاهد (Sham)، روغن کنجد را به عنوان حلال دریافت نمودند. نتایج بر اساس میانگین و انحراف استاندارد (Mean  $\pm$  SEM) هر گروه تنظیم شده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۷ سر است.  $P < 0.001$  \*\*\*،  $P < 0.05$  \* اختلاف از گروه شاهد را نشان می‌دهند.

همچنین اسکوپولامین در غلظت ۱ و ۵ میکروگرم/رت، موجب افزایش معنی‌داری بر میزان STL در مقایسه با گروه شاهد (Sham) گردید (نمودار ۲).



نمودار ۲ - اثر تزریق درون‌بطنی اسکوپولامین با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ میکروگرم/رت بر میزان STL در موش صحرائی نر بالغ. تزریقات فوراً پس از دریافت شوک در جلسه آموزش صورت گرفت. حیوانات کنترل (Con.) هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند. حیوانات گروه شاهد (Sham)، سرم فیزیولوژیک را به عنوان حلال دریافت نمودند. نتایج بر اساس میانگین و انحراف استاندارد (Mean ± SEM) هر گروه تنظیم شده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۷ سر است.  $P < 0.05$ ،  $P < 0.001$ ،  $P < 0.0001$  اختلاف از گروه شاهد را نشان می‌دهند.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اسکوپولامین در غلظت ۵ میکروگرم/رت، موجب افزایش معنی‌داری بر پاسخ القاء شده توسط ویتامین A در غلظت ۱۰۰۰ IU/rat می‌شود (نمودار ۳).



نمودار ۳ - اثر تزریق درون‌بطنی اسکوپولامین (با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ میکروگرم/رت) توأم با ویتامین A (IU/rat) ۱۰۰۰ بر مدت زمان احتراز از ورود به اتاق تاریک (STL) بر حسب ثانیه. تزریقات فوراً پس از دریافت شوک در جلسه آموزش صورت گرفت. نتایج براساس میانگین ± خطای استاندارد (Mean ± SEM) هر گروه تنظیم شده است (n=7).  $P < 0.05$  \* اختلاف از گروه شاهد و  $P < 0.01$  ++ اختلاف از گروه ویتامین A را نشان می‌دهند. حیوانات کنترل (Con.) هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند. حیوانات گروه شاهد (Sham)، روغن کنجد را به عنوان حلال دریافت نمودند.

## بحث

یافته‌های فاقد  $RAR\beta/RXR\gamma$  در نواحی  $CA_1$

حذف می‌گردد و در این موش‌ها انعطاف‌پذیری سیناپسی، تضعیف شده، حافظه و یادگیری فضایی، با نواقصی همراه می‌شود (۲۰۰۷، ۱۴، ۲۳).

مطالعات انجام شده روی انسان و حیوان نشان داده است که ممکن است سیستم کولینرژیک، به‌خصوص گیرنده‌های استیل کولینی موسکارینی، نقشی در حافظه داشته باشند (۲۹-۲۴).

نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که اسکوپولامین، موجب کاهش معنی‌داری بر میزان تثبیت و به‌یادآوری حافظه می‌گردد. تحقیقات صورت گرفته حاکی از آن است، که به‌کار بردن اسکوپولامین به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی، باعث کاهش غلظت اینوزیتول تری‌فسفات می‌شود و اثر مهاری خود را از طریق ممانعت از هیدرولیز فسفوااینوزیتیدها به انجام می‌رساند (۳۱، ۲۵، ۳۰).

همچنین تحقیق حاضر نشان داد که تداخل معنی‌داری بین تزریق توام ویتامین A و اسکوپولامین در میزان پاسخ‌های شرطی در شیوه احترازی غیرفعال وجود دارد. اسکوپولامین از طریق انسداد گیرنده‌های کولینرژیک، موجب آسیب حافظه می‌شود. در نتیجه هرگونه اختلال در عمل نورون‌های کولینرژیک، موجب اختلال در یادگیری و حافظه فضایی می‌شود (۳۳، ۳۲).

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حوزه پژوهشی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی به دلیل حمایت مالی از تحقیق حاضر قدردانی می‌گردد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ویتامین A، موجب افزایش معنی‌داری بر میزان تثبیت و به‌یادآوری حافظه می‌گردد. گزارش‌های متعددی، اثر ویتامین A را بر بهبود حافظه و یادگیری تایید می‌کند (۱۰) و نشان داده شده است که در موش‌هایی با جهش گیرنده‌های اسید رتینوئیک، فقدان ویتامین A سبب اختلال در فرآیندهای یادگیری می‌شود (۷، ۱۹). تاثیر ویتامین A روی یادگیری کاملاً وابسته به غلظت است (۲۱، ۲۰). در خصوص مکانیسم اثر اسید رتینوئیک بر فعالیت‌های نورونی، نظرات متفاوتی گزارش شده است، از جمله این که اسید رتینوئیک، در انعطاف‌پذیری سیناپسی طولانی‌مدت در مغز بالغ، موثر بوده (۲۲) و انعطاف‌پذیری سیناپسی در هیپوکامپ را نیز تعدیل می‌کند (۱۳)، به طوری که تنظیم بیان ژن‌های وابسته به رتینوئیدها، در عملکرد طبیعی مغز ضروری بوده (۱۴) و تغییر در مسیر انتقال پیام ناشی از اسید رتینوئیک، منجر به آسیب حافظه و یادگیری موش‌های بالغ می‌شود (۲۳). تقویت طولانی‌مدت (LTP) در حیواناتی که گیرنده‌های اسید رتینوئیک آن‌ها به طور ژنتیکی حذف شده، کاهش چشمگیری نشان می‌دهد (۱۳). بنابراین، اسید رتینوئیک تزریق شده در منطقه  $CA_1$  می‌تواند از طریق اعمال تغییرات اشاره شده، از جمله تغییر در انعطاف‌پذیری سیناپسی در  $CA_1$  و یا تغییر در بیان ژن‌های دخیل در پدیده‌های یادگیری و حافظه مربوط به هیپوکامپ، اثر خود را به جای بگذارد. فقدان یکی از گیرنده‌های رتینوئیدی یا هر دوی آن‌ها باعث اختلال در یادگیری موش‌های صحرایی می‌شود (۲۱). LTP در موش‌های جهش‌یافته، فاقد  $RAR\beta$  و جهش

## منابع مورد استفاده

1. Duester, G., Mic, F. A., Molotkov, A., 2003. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 143: 201-210.
2. Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A., Carta, M., Curreli, R., 2002. Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115: 475-482.
3. Tafti, M., Ghyselinck, N. B., 2007. Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. *Arch Neurol* 64: 1706-1711.

4. Miano, J. M., Berk, B. C., 2000. Retinoids: Versatile biological response modifiers of vascular smooth muscle phenotype. *Circ Res* 87: 355-362.
5. Lane, M. A., Bailey, S. J., 2005. Role of retinoid signaling in the adult brain. *Prog Neurobiol* 75: 275-293.
6. Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H., Higuieret, P., 1997. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett* 229: 125-129.
7. Ching, M. Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Schikorski, T., Giguère, V., Sucov, H. M., Gage, F. H., Stevens, C. F., Evanset, R. M., 1998. An essential role for retinoid receptors RAR- $\beta$  and RXR- $\delta$  in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21: 1353-1361.
8. Kurlandsky, S. B., Gambel, M. V., Ramakrishnan, R., Blaner, W. S., 1995. Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J Biol Chem* 270: 17850-17857.
9. Silveira, E. R., Moreno, F. S., 1998. Natural retinoids and  $\beta$ -carotene: from food to their actions on gene expression. *Nutr Biochem* 9: 446-456.
10. Zetterstrom, R. H., Lindqvist, E., Urquiza, A. M. D., Tomac, A., Eriksson, U., Perlmann, T., Olson, L., 1999. Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoids binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Neuroscience* 11: 407-441.
11. Berrard, S., Fauson Biguet, N., Houhou, L., Lamouroux, A., Mallet, J., 1993. Retinoic acid induces cholinergic differentiation of cultured newborn rat sympathetic neurons. *Neurosci Res* 35: 385-389.
12. Berse, B., Blusztajn, J. K., 1997. Modulation of cholinergic locus expression by glucocorticoids and retinoic acid is cell-type specific. *FEBS Letters* 410: 175-179.
13. Farooqui, A. A., Antony, P., Ong, W. Y., Horrocks, L. A., Freysz, L., 2004. Retinoic acid-mediated phospholipase A signaling in the nucleus. *Brain Res Rev* 45: 179-195.
14. Husson, M., Enderlin, V., Alfos, S., Boucheron, C., Pallet, V., Higuieret, P., 2004. Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Mol Brain Res* 123: 7-17.
15. Werner, E. A., Delusa, H. F., 2002. Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am J Physiol Endoc M* 282: 672-678.
16. Koppen, A., Klein, J., Erb, C., Loffelholz, K., 1997. Acetylcholine release and choline availability in rat hippocampus. Effects of exogenous choline and nicotinamide. *Exp Ther* 282: 1139-1145.
17. Fukuchi, K., Deeb, S. S., Kamino, K., Ogburn, C. E., Snow, A. D., Sekiguchi, R. T., 1992. Increased expression of beta-amyloid protein precursor and microtubule-associated protein T during the differentiation of marine embryonal carcinoma cells. *J Neurochem* 58: 1863-1873.
18. Fornari, R. V., Moreira, K. M., Oliveira, M. G. M., 2000. Effects of the selective M<sub>1</sub> muscarinic receptor antagonist dicyclomine on emotional memory. *Learning and Memory* 7: 287-292.
19. Drager, U. C., 2006. Retinoic acid signaling in the functioning brain. *Sci STKE* 324: 10.
20. Afarinesh, M., Moazedy, A. A., Abbasnegad, M., 2003. The effect of Lecithin and retinoic acid on spatial learning in adult male rat. *Journal of Biology of Iran* 17: 261-271.
21. Afarinesh, M., Moazedy, A. A., Abbasnegad, M., 2003. The effect of retinoic acid on spatial learning of adult male rat. *Journal of Razi Faculty of Nursing and Midwifery* 3: 31-38.
22. Mao, C. T., Li, T. Y., Liu, Y. X., Qu, P., 2005. Effects of marginal vitamin A deficiency and intervention on learning and memory in young rats. *Zhonghua Er Kr Za Zhi* 43: 526-530.
23. Alfos, S., Boucheron, C., Pallet, V., Higuieret, D., Enderlin, V., Beracochea, D., Jaffard, R., Higuieret, P., 2001. Retinoic acid receptor antagonist suppresses brain retinoic acid receptor over expression and reverses a working memory deficit induced by chronic ethanol consumption in mice. *Alcoholism Clin Exp Res* 25: 1506-1514.
24. Kopelman, M. D., 1986. The cholinergic neurotransmitter system in human memory and dementia: A review. *Quarterly Journal of Experimental Psychology* 38: 535-573.
25. Bymaster, F. P., Heath, I., Hendrix, J. C., Shannon, H. E., 1993. Comparative behavioral and neurochemical activities of cholinergic antagonists in rats. *Journal of Pharmacol Experimentellen Therapie* 267: 16-24.
26. Hitchcott, P. K., Bonardi, C. M. T., Phillips, G. D., 1997. Enhanced stimulus-reward learning by intra-amygdala administration of a D<sub>3</sub> dopamine receptor agonist. *Psychopharmacology* 133: 240-248.
27. Terry, A. V., Buccafusco, J. J., Jackson, W. J., 1993. Scopolamine reversal of nicotine

- enhanced delayed matching-to-sample performance in monkeys. *Pharmacology Biochemistry and Behavioral* 45: 925-929.
28. Brucato, F. H., Mott, D. D., Lewis, D. V., Swartzwelder, H. S., 1995. GABA-B receptors modulate synaptically-evoked responses in the rat dentate gyrus, *in vivo*. *Brain Research* 677: 326-332.
  29. Jackson, D. M., Ross, S. B., Hashizume, M., 1988. Dopamine-mediated behaviors produced in naive mice by bromocriptine plus SKF 38393. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 40: 221-223.
  30. Patel, S., Freedman, S. B., 1994. The muscarinic-receptor agonist L-658, 903 modulates the *in vivo* accumulation of inositol monophosphates in mouse brain. *Eur J Pharmacol* 267: 329-334.
  31. Bymaster, F. P., Carter, P. A., Zhang, L., Falcone, J. F., Stengel, P. W., Cohen, M. L., Shannon, H. E., Gomez, J., Wess, J., Felder, C. C., 2001. Investigations into the physiological role of muscarinic M<sub>2</sub> and M<sub>4</sub> muscarinic receptor subtypes using receptor knockout mice. *Life Sci* 68: 2473-2479.
  32. Santucci, A. C., Kanof, P. D., Haroutunian, V., 1989. Effect of physostigmine on memory consolidation and retrieval processes in intact and nucleus basalis-lesioned rats. *Psychopharmacology* 99: 70-74.
  33. Haroutunian V., Kanof, P. D., Tsuboyama, G., Davis, K. L., 1990. Restoration of cholinomimetic activity by clonidine in cholinergic plus noradrenergic lesion rats. *Brain Research* 507: 261-266.